

文章编号 : 0253-9950(2005)01-0043-04

乏氧显像剂 1-H-1-(3-¹⁸F-2-羟基丙基)-2-硝基咪唑的自动化合成

唐刚华, 王明芳, 罗 磊, 甘满权

南方医科大学 南方医院 核医学科 PET 中心, 广东 广州 510515

摘要: 为了制备 1-H-1-(3-¹⁸F-2-羟基丙基)-2-¹⁸F-硝基咪唑 (¹⁸F-FMISO), 采用“一锅法”和 Tracerlab FX_{F-N} 自动化合成装置, 以 1-(2-硝基-1-咪唑基)-2-O-四氢吡喃基-3-O-甲苯磺酰基丙二醇为原料, 经亲核氟化、水解两步反应制备 ¹⁸F-FMISO 注射液。总合成时间小于 60 min, 放化产率和放化纯度分别大于 60% 和 99%。采用“一锅法”自动化合成 ¹⁸F-FMISO, 操作简便, 能满足科研和临床正电子发射断层显像的需要。

关键词: ¹⁸F-FMISO; 乏氧显像剂; 自动化合成

中图分类号: O615.3 **文献标识码:** A

细胞在有氧状态下比在缺氧状态下对射线更为敏感。因此, 测定放疗前肿瘤细胞缺氧状态是评估放疗效果的有效手段。2-¹⁸F-2-脱氧-D-葡萄糖 (¹⁸F-FDG) 是应用最广的肿瘤正电子发射断层 (PET) 显像剂, 但采用 FDG 进行 PET 测定乏氧肿瘤缺乏特异性。1-H-1-(3-¹⁸F-2-羟基丙基)-2-硝基咪唑 (¹⁸F-fluoromisonidazole, ¹⁸F-FMISO) 是一种常用的乏氧硝基咪唑类 PET 显像剂, 与乏氧细胞具有较高亲和力, 能选择性地与肿瘤乏氧细胞结合。采用 ¹⁸F-FMISO 进行 PET 显像为肿瘤乏氧状况提供了无创伤性评估方法。目前, 已用于测定鼻咽癌、头颈部肿瘤乏氧状态, 预测化疗效果, 也可测定心脑血管缺血性区域^[1,2]。¹⁸F-FMISO 的制备及自动化合成国外已有文献报道^[3,4], 但国内尚无这方面的研究报道。因此, 研究简便高产率自动化合成 ¹⁸F-FMISO 具有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

PET trace 回旋加速器和 Tracerlab FX_{F-N} 自动化合成系统, 美国 GE 公司产品; LC-10AT

HPLC 分析系统, 日本 Shimadzu 公司产品, 配有 LB 508 型放射性液流探测器, 德国 EG & G 公司产品; CS-9301 PC 薄层层析扫描仪, 日本 Shimadzu 公司产品; 计数仪, 上海应用物理研究所产品; CRC-15R 型活度计, 美国 CAPINTEC 公司产品。

乙腈, Aldrich 公司产品; 1,2-二对甲苯磺酸乙二酯, 美国 Sigma 公司产品; Kryptofix 2.2.2 (K222), 德国 Merck 公司产品; 1-(2-硝基-1-咪唑基)-2-O-四氢吡喃基-3-O-甲苯磺酰基丙二醇 (NITTP), 德国 ABX 公司产品; Sep Pak QMA 和 Sep Pak Plus Silica 小柱, 美国 Waters 公司产品; 硅胶 60 薄层层析铝板, 德国 Merck 公司产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 FMISO 的合成路线

采用“一锅法”完成 FMISO 的自动化合成。即以 1-(2-硝基-1-咪唑基)-2-O-四氢吡喃基-3-O-甲苯磺酰基丙二醇 (1) 为原料, 与 ¹⁸F⁻ 发生亲核取代反应生成 1-(2-硝基-1-咪唑基)-2-O-四氢吡喃基-3-¹⁸F-丙醇 (2), 后者不经纯化, 直接加盐酸水解, 加碱中和, 用 HPLC 法分离纯化得 ¹⁸F-FMISO 注射液^[3]。合成路线如下:

收稿日期: 2004-04-25; 修订日期: 2004-08-02

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2003C34304); 第一军医大学南方医院院长基金资助项目 (991015)

作者简介: 唐刚华 (1966-), 男, 湖南东安人, 副教授, 博士后, 主要从事 PET 药物研制及 PET 分子影像学研究。

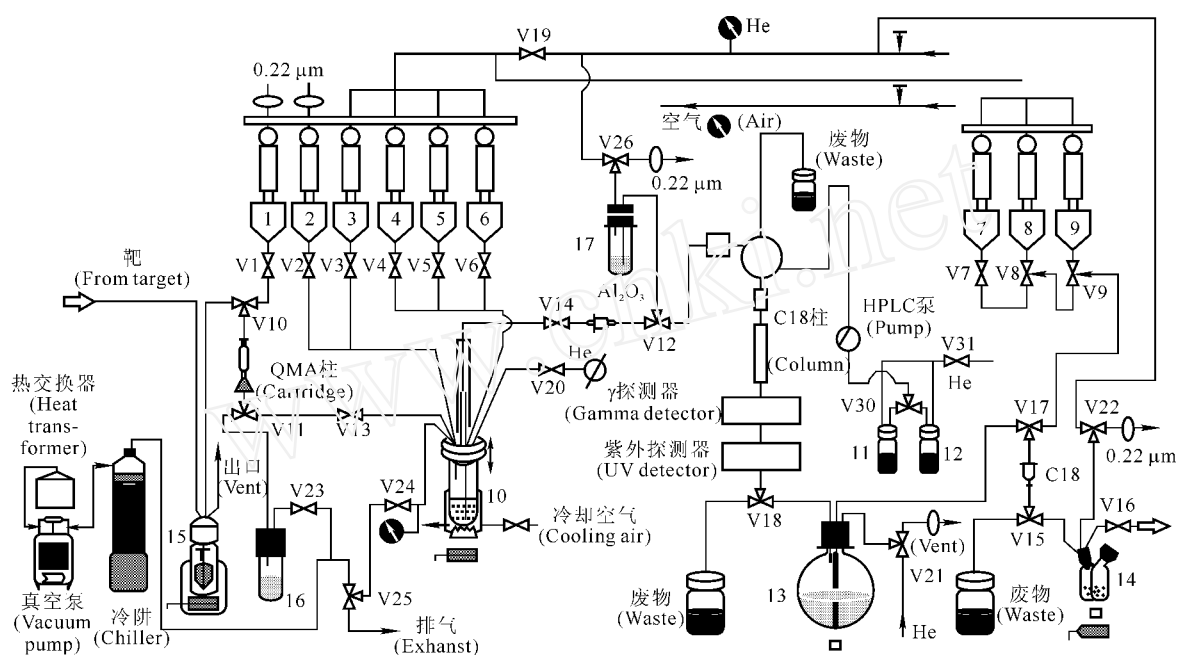
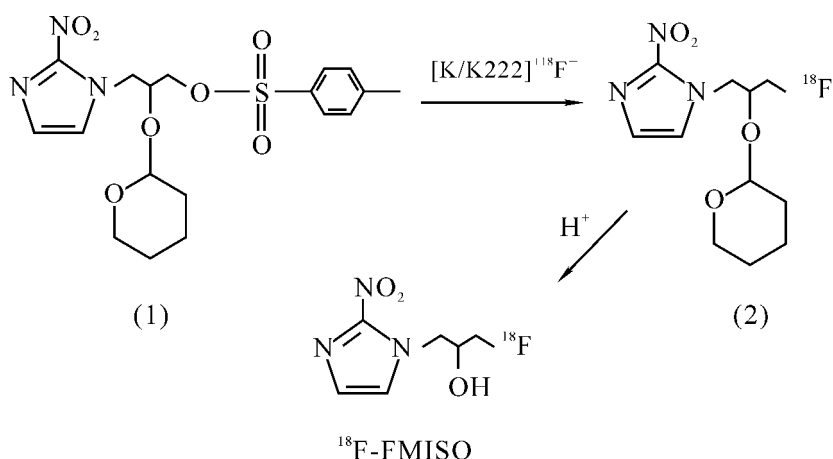


图 1 $^{18}\text{F-FMISO}$ 自动合成装置示意图

Fig. 1 Diagram of the automated system for the synthesis of $^{18}\text{F-FMISO}$

1.3 $^{18}\text{F-FMISO}$ 的自动合成

$^{18}\text{F-FMISO}$ 自动合成装置示于图 1。主要包括 $^{18}\text{F-F}^-$ 分离、氟化水解和 HPLC 分离等部分。它们由气体传输系统 (He 气)、真空泵系统、反应瓶 (10)、贮液瓶 (1~9、11、12)、接收瓶 (13~17)、废物瓶、阀门 (V1~V31)、分离小柱 (QMA、 Al_2O_3 、C18)、HPLC 系统 (流动相, 进样环, HPLC 泵, C18 分离柱, 紫外探测器, 放射性探测器)、电加热系统、空气冷却系统、磁搅拌系统、管路系统、无菌过滤器及计算机控制系统等组成。

1.3.1 自动化合成前的准备 检查冷阱是否干燥 (如不是, 需替换), 在杜瓦 (Dewar) 瓶中加入液氮。打开真空泵、压缩空气和惰性气体开关。在

1 和 2 号瓶的排气口上安装无菌过滤器。在产品导出管上安装 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌过滤膜和无菌针头, 针头插入用隔膜密封的无菌真空接收瓶中, 接收瓶另接一只带有过滤器的无菌排气针头。在 V10 和 V11 之间连接 $^{18}\text{F}^-$ 阴离子捕集柱, 在 V14 和 V12 之间连接 Al_2O_3 分离柱 (Sep-Pak Alumina N), 并直接连接 V18 和 V15 之间的管路。在 1 号瓶中加入溶于 1 mL 乙腈和 0.5 mL 水中的 15 mg 相转移催化剂氨基聚醚 4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂双环 [8,8,8] 廿六碳烷 (Kryptofix 2.2.2.) 和 3 mg K_2CO_3 溶液, 3 号瓶中加入 1 mL HPLC 水-乙醇淋洗液 (体积比 95:5), 4 号瓶加入 1 mL 1 mol/L 盐酸, 5 号瓶加入 0.5 mL

30%乙酸钠,6号瓶加入溶于1 mL 二甲基亚砜(DMSO)的5 mg 前体 NITTP 溶液,11号瓶中加入 HPLC 水-乙醇淋洗液(体积比 95:5),14号瓶中添加 10 倍于峰值体积的注射用水。设置紫外(UV)检测波长为 220 nm。关闭热室防护门。

1.3.2 自动化合成 从 Tracerlab FX_{F-N} 软件的菜单中选择 ¹⁸F-FMISO 合成方法,按下“start”按钮,在计算机控制下完成 ¹⁸F-FMISO 自动化合成。由回旋加速器通过 ¹⁸O(p,n)¹⁸F 核反应生产的 ¹⁸F-F⁻,在 He 气传输下收集在瓶 15 中。打开真空泵,瓶 15 中含 ¹⁸F-F⁻ 靶水经 Sep-Pak QMA 阴离子小柱,¹⁸F-F⁻ 被捕集在柱上,¹⁸O-水被收集在回收瓶 16 中。在真空泵作用下,1号瓶中含 K₂CO₃ 和 Kryptofix 2.2.2. 的乙腈水溶液将 ¹⁸F-F⁻ 洗脱入反应瓶 10 中,加热混合溶液至 85℃,减压蒸干,得到干燥的 [K/K222]⁺¹⁸F⁻ 复合物,废液由置于液氮中的冷阱吸收。在 He 气作用下,6号瓶中的前体(NITTP)溶液被压入反应瓶 10 中,100℃ 加热反应 10 min。氟化反应完成后,4号瓶中 HCl 溶液被压入反应瓶 10 中,100℃ 加热 5 min。水解完毕后,5号瓶中乙酸钠溶液被压入反应瓶 10 中,中和酸溶液。粗产品通过 Sep-Pak Al₂O₃ 小柱,未反应的 ¹⁸F-F⁻ 被吸附。3号瓶中 HPLC 淋洗液在 He 气压力作用下通过 Sep-Pak Al₂O₃ 小柱,初步纯化后的产品经 HPLC 分离柱进一步纯化,在 14号瓶中收集终产品 ¹⁸F-FMISO 注射液。最后经 He 气作用,传输至无菌产品瓶中。HPLC 分离条件:流动相为水-乙醇溶液(体积比 95:5),流速 8 mL/min,紫外(UV)检测波长为 220 nm。

1.4 产品的质量控制

用精密 pH 试纸测定注射液的 pH 值,目测其颜色和澄清度;取即时制备的 ¹⁸F-FMISO 注射液,用活度计测定不同时间点的活度值,用半对数作图法估测半衰期和核纯度;用 HPLC 系统测定注射液的化学纯度和放射化学纯度,HPLC 分析条件:C18 分析柱,流动相为 95%的乙醇溶液,流速为 1 mL/min,紫外(UV)检测波长为 220 nm^[2];在室温下,测定注射液在 8 h 内不同时间的放化纯度,观测其稳定性;参照中华人民共和国药典 2000 年版二部附录所述方法进行无菌检查、细菌内毒素检查及异常毒性检查。

细菌内毒素检查:取装有 0.1 mL 鲎试剂的密封小瓶 5 支,其中 2 支加入 0.1 mL、按最大有

效稀释倍数稀释的 ¹⁸F-FMISO 注射液作为供试品管,1支加入 0.1 mL、用细菌内毒素检查用水将细菌内毒素工作标准品制成的 2.0 U 浓度的内毒素溶液作为阳性对照管,1支加入 0.1 mL 细菌内毒素检查用水作为阴性对照管,1支加入 0.1 mL 供试品阳性对照溶液(用被测供试品溶液将同一支细菌内毒素工作标准品制成 2.0 U 浓度的内毒素溶液)作为供试品阳性对照管。将试管中溶液轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入(37 ± 1)℃ 适宜恒温器中,保温(60 ± 2) min。

2 结果和讨论

¹⁸F-FMISO 的合成主要有两种方法:一种方法为含保护基团的前体经亲核取代反应后除去保护基团^[3,4]或者环氧烷基开环^[5],即可得到目标化合物 ¹⁸F-FMISO;另一种方法为前体经亲核取代反应后生成中间体 ¹⁸F-epifluorohydrin,尔后在碱性条件下,¹⁸F-epifluorohydrin 与硝基咪唑偶合生成 ¹⁸F-FMISO。前一种方法相对简单,容易实现自动化合成,特别是经亲核取代反应后除去保护基团法,不仅方法简单,容易自动化,而且合成时间短,放化产率高。本工作以 1-(2-硝基-1-咪唑基)-2-O-四氢吡喃基-3-O-甲苯磺酰基丙二醇(NITTP)为前体,采用亲核氟化和水解除保护基团两步反应的“一锅法”合成工艺,实现用 Tracerlab FX_{F-N} 装置自动化合成 ¹⁸F-FMISO 注射液,总合成时间小于 60 min,总校正放化产率大于 60%。前体 NITTP 光谱鉴定数据 ¹H NMR (CDC13, 300 MHz), δ: 7.80 (t, 2H), 7.37 (d, 2H), 7.10 (s, 2H), 4.79 (dd, 1H), 4.36 (dd, 1H), 4.27 ~ 4.17 (m, 2H), 4.09 ~ 4.00 (m, 2H), 3.62 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 2.46 (s, 3H, CH₃), 1.67 ~ 1.53 (m, 2H), 1.46 ~ 1.32 (m, 4H)。IR: 2941, 2862, 1672, 1534, 1482, 1364, 1174, 1116, 1089, 1037, 958, 828, 664 cm⁻¹。MS: (M⁺ - NO₂): 379。由于该法放化产率较高(大于 60%),因而没有进一步对反应条件进行优化。正是由于本研究对放化合成条件没有进行进一步优化,所使用的前体 NITTP 化学量低于文献值,因而造成合成 ¹⁸F-FMISO 的放化产率和比活度低于国外文献报道值(放化产率大于 80%)^[3]。该法最大的缺点就是市售前体价格相当昂贵,造成制备 ¹⁸F-FMISO 成本相当高。因此,研究简单方法自制前体非常必要。

^{18}F -FMISO 注射液为无色溶液, pH 值约为 7.0, 放射性浓度大于 50 MBq/mL, 比活度不小于 3.7×10^{10} Bq/mmol。用时间衰变法测定 ^{18}F 半衰期约为 110 min, 放射性核纯度大于 99%。按本文所述制备 ^{18}F -FMISO 的方法合成标准品 1-(3-氟-2-羟基丙基)-2-硝基咪唑 (^{19}F -FMISO), 其结构经元素分析、MS 和 NMR 鉴别证实, 标准品也可购于德国 ABX 公司。元素分析(按 $\text{C}_6\text{H}_8\text{FN}_3\text{O}_3$ 计)的实验值: C, 38.09%, H, 4.26%, N, 22.01%, F, 10.41%; 理论值: C, 37.93%, H, 4.21%, N, 22.08%, F, 10.11%。 ^1H NMR (DMSO, δ): 7.64 (s, imid-H), 7.22 (s, imid-H), 5.64 (d, 1H, -CH(OH)-), 4.65 (dd, 1H), 4.48 ~ 4.58 (m, 1H), 4.32 ~ 4.46 (m, 2H), 4.00 ~ 4.10 (m, 1H, -CH(OH)-)。 ^{13}C NMR (DMSO, δ): 144.91 (s, imid-C(2)), 128.52 (s, imid-C(5 or 4)), 127.35 (s, imid-C(5 or 4)), 84.58 (d, -CH₂F), 67.70 (d, -CH(OH)-), 51.41 (d, imid-CH₂CH(OH)-)。 ^{19}F NMR (DMSO, δ): 230.7 (td)。MS (EI, m/z): 189 (M^+)。

用分析型 HPLC 法测定 ^{18}F -FMISO 注射液, ^{18}F -FMISO 与标准品 ^{19}F -FMISO 的保留时间一致, $t_{\text{R}} = 4.3$ min, 化学纯度约 100%, 放射化学纯度大于 99%。经放射性 HPLC 法测定, ^{18}F -FMISO 注射液在 6 h 内放射化学纯度没有发生明显变化, 均大于 95%。异常毒性检查: 尾静脉给予 ^{18}F -FMISO 注射液后, 观察 48 h, 小鼠生长正常, 无死亡及不良反应现象发生, 解剖后观察, 未见任何器官损伤。无菌检查和细菌内毒素检查均为阴性。放射化学纯度、异常毒性检查、无菌检查及细菌内毒素检查等指标符合放射性药物质量要求。尽管本研究未对体内 ^{18}F -FMISO 吸收剂量进行估算, 但 Graham 等^[6]估算了体内 ^{18}F -FMISO 内照射剂量当量。他们的研究表明, 成年男女 ^{18}F -FMISO 的剂量当量分别为 0.013 mSv/MBq 和 0.014 mSv/MBq, 男女单个器官吸收剂量没有差别, 膀胱壁是接受吸收剂量最高的器官, 在 2 h 和 4 h 排尿间隔内膀胱壁的吸收剂量分别为 0.021 mGy/MBq 和 0.029 mGy/MBq。按一次静脉注射 ^{18}F -FMISO 注射液 370 MBq 计

算, 各器官的吸收剂量均低于 50 mGy。可见, 合成的 ^{18}F -FMISO 注射液应是安全的, 可用于动物和人体实验研究。

3 结 论

采用 Tracerlab FX-FN 自动化合成装置, 以 1-(2-硝基-1-咪唑基)-2-O-四氢吡喃基-3-O-甲磺酰基丙二醇 (NITTP) 为原料, 在一锅内完成亲核氟化、水解两步反应, 自动化合成 ^{18}F -FMISO 注射液, 总合成时间小于 60 min, 放化产率和放化纯度分别大于 60% 和 99%。该法操作简便, 合成的 ^{18}F -FMISO 注射液能满足科研和临床正电子发射断层显像的需要。

参考文献:

- [1] 唐刚华. PET 药物及其研究现状与进展[J]. 国外医学放射医学核医学分册, 1999, 23(5): 193 ~ 197.
- [2] Gronroos T, Bentzen L, Marjamki M, et al. Comparison of the Biodistribution of Two Hypoxia Markers [^{18}F]FETNIM and [^{18}F]FMISO in an Experimental Mammary Carcinoma [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2004, 31(4): 513 ~ 520.
- [3] Patt M, Kuntzsch M, Machulla HJ. Preparation of Fluoromisonidazole by Nucleophilic Substitution on THP-protected Precursor: Yield Dependence on Reaction Parameters [J]. J Radioanal Nucl Chem, 1999, 240(3): 925 ~ 927.
- [4] Kamarainen EL, Kyllonen T, Nihtila O, et al. Preparation of Fluorine-18-labelled Fluoromisonidazole Using Two Different Synthesis Methods [J]. J Label Compd Radiopharm, 2004, 47(1): 37 ~ 45.
- [5] Jerabek PA, Patrick TB, Kilbourn R, et al. Synthesis and Biodistribution of ^{18}F -labeled Fluoromisonidazoles: Potential *in vivo* Markers of Hypoxia Tissue [J]. Appl Radiat Isot, 1986, 37(7): 599 ~ 605.
- [6] Graham MM, Peterson LM, Link JM, et al. Fluorine-18-fluoromisonidazole Radiation Dosimetry in Imaging Studies [J]. J Nucl Med, 1997, 38(10): 1631 ~ 1636.

(下转第 64 页, Continued on page 64)

Effect of Heating Temperature on Emanation Coefficient of Rn

PANG Rong-hua¹, TONG Chun-han², LIU Xiao-hui²

1. Sichuan Management and Monitoring Center Station of Radioactive Environment, Chengdu 610031, China;
2. College of Applied Nuclear Technology and Automation Engineering, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China

Abstract: For developing a method to reduce the emanation coefficient of Rn in materials, emanation coefficient of Rn in geological uranium materials such as zircon, uranium-bearing ore, etc is measured. Heating is used to study the effect of heating temperature on emanation coefficient of Rn. The results show after heating, the emanation coefficient of Rn in above materials decreases gradually according to the heating temperature increasing. Heating can reduce the emanation coefficient of Rn effectively, which can be used as a new measure to defend against radon and radon daughters.

Key words: emanation; emanation coefficient of Rn; uranium material

(上接第 46 页, Continued from page 46)

Automated Synthesis of ¹⁸F-Labelled Fluoromisonidazole as Hypoxia Imaging Agent

TANG Gang-hua, WANG Ming-fang, LUO Lei, GAN Man-quan

PET Centre, Department of Nuclear Medicine, Nan Fang Hospital,
Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: 1-H-1-(3-[¹⁸F]-fluoro-2-hydroxypropyl)-2-nitroimidazole (¹⁸F-FMISO) is synthesized by "one pot" method at Tracerlab FX_{FN} system. By using 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-O-tetrahydropyranyl-3-O-toluenesulphonyl-propanediol as the precursor, ¹⁸F-FMISO is obtained *via* two-step reactions, including the nucleophilic fluorination of the precursor to yield an intermediate 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-O-tetrahydropyranyl-3-[¹⁸F]-fluoropropanol, and the acidic hydrolysis of the intermediate. The procedure is quite simple and can be completed within 60 min. The radiochemical yield and radiochemical purity are higher than 60% and 99%, respectively. Toxicological assays indicate that the final product is bacteria-free and non-toxic, and meets the requirements for radiopharmacy. It can be used in clinical and scientific research.

Key words: ¹⁸F-FMISO; hypoxia imaging agent; automated synthesis